

JAIME APARECIDO CURY

CONSTITUINTES DA PAREDE CELULAR DE *PICNOPORUS CINNABARINUS*
EM FUNÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

TESE DE MESTRADO APRESENTADA
AO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ

CURITIBA

1974

JAIME APARECIDO CURY

CONSTITUINTES DA PAREDE CELULAR DE
Picenoporus cinnabarinus EM FUNÇÃO
DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO .

Tese de Mestrado apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

1974

Tese orientada pela

Dra. Déa Amaral F. do Amaral

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS	5
1, Microrganismo	5
2, Condições de Cultivo	5
3, Crescimento em Meio Sólido	5
4, Purificação das Paredes Celulares	6
5, Exame ao Microscópio Eletrônico	6
6, Determinação de Açúcares Totais	7
7, Determinação de Proteínas	7
8, Análise de Lipídeos	7
9, Dosagem de Fósforo Total	7
10, Estudo dos Açúcares Neutros da Parede Celular de <u>Picnopus cinnabarinus</u>	7
10,1, Condições Ótimas de Hidrólise	7
10,2, Determinação Quantitativa e Caracterização	8
11, Ação Enzimática do Suco Digestivo de <u>Megalobolus paranaguenses</u> sobre as Paredes Celulares de <u>P. cinnabarinus</u>	9
12, Estudo dos Açúcares Aminados da Parede Celular - de <u>P. cinnabarinus</u>	9
12,1, Condições Ótimas de Hidrólise	9
12,2, Fracionamento e Caracterização	9
12,3, Determinação de N-acetilglucosamina	11
13, Estudo dos Açúcares Ácidos	11
14, Reagentes Utilizados	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
1, Crescimento de <u>P. cinnabarinus</u> em Meio Sólido	13
2, Microscopia Eletrônica de <u>P. cinnabarinus</u>	13
3, Purificação das Paredes Celulares de <u>P. cinnabarinus</u>	13
4, Conteúdo de Lipídeos das Paredes Celulares de <u>P. cinnabarinus</u>	14
5, Determinação de Fósforo Total das Paredes Celulares de <u>P. cinnabarinus</u>	15
6, Determinação de Proteínas das Paredes Celulares de <u>P. cinnabarinus</u>	15
7, Determinação de Açúcares Totais das Paredes Celulares de <u>P. cinnabarinus</u>	16

8.	Composição em Açúcares Neutros das Paredes Celulares de <u>P. cinnabarinus</u>	16
9.	Composição em Açúcares Aminados das Paredes Celulares de <u>P. cinnabarinus</u>	18
10.	Ação Enzimática do Suco Digestivo de <u>Megalobolus paranaguenses</u> sobre as Paredes Celulares de <u>P. cinnabarinus</u>	20

FIGURAS

Figs. 1 e 2	Crescimento de <u>P. cinnabarinus</u> em meio sólido	22
Figs. 3 e 4	Microfotografia de <u>P. cinnabarinus</u> crescido - em meio sólido	23
Figs. 5 e 6	Micrografia eletrônica de <u>P. cinnabarinus</u> - crescido em meio líquido	24
Fig. 7	Comprovação da purificação da parede celular de <u>P. cinnabarinus</u> crescido em D-glucose	25
Fig. 8	Comprovação da Purificação da parede celular de <u>P. Cinnabarinus</u> crescido em acetato	26
Figs. 9 e 10	Micrografia eletrônica das paredes celulares	27
Fig. 11	Curva de Hidrólise para o estudos dos açúcares neutros	28
Fig. 12	Cromatografia em fase gasosa dos açúcares / neutros	29
Fig. 13	Curva de Hidrólise para o estudo dos açúcares aminados	30
Fig. 14	Fracionamento das hexosaminas	31
Fig. 15	Ação do suco digestivo de <u>M. paranaguenses</u> nas paredes celulares	32

TABELAS

Tab. I	Composição das Paredes Celulares	33
Tab. II	Caracterização das hexosaminas das paredes celulares em função de seus R _{glucosamina}	33
Tab. III	Relação entre o teor de glucose e N-acetilglucosamina das paredes celulares e o liberado pelas enzimas do suco digestivo de <u>M. paranaguenses</u>	34

RESUMO	35
--------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
----------------------------	----

INTRODUÇÃO

A parede celular dos fungos é um envoltório permanente e versátil, que expandindo-se continuamente durante o crescimento e remodelando-se no seu desenvolvimento, permite ao fungo assumir uma variedade de características morfológicas, adaptando-o a diferentes funções. O estudo de sua composição está relacionado com a taxonomia (Filogenia), com a morfogênese (Ontogenia), e com o comportamento patogênico de fungos.

Uma correlação entre a composição química da parede celular e os principais grupos taxonômicos, elaborada com critérios morfológicos, foi mostrada já no último século. Porém, com o aprimoramento tecnológico novas características peculiares / surgiram, e uma classificação foi apresentada (1) relacionando as categorias químicas com os grupos taxonômicos, conforme tabela abaixo.

CATEGORIA QUÍMICA	GRUPO TAXONOMICO
I. Celulose-Glicogênio	Acrasiales
II. Celulose-Glucano	Oomicetos
III. Celulose-Quitina	Hifoquitridiomietos
IV. Quitosana-Quitina	Zigomicetos
V. Quitina-Glucano	Quitridiomietos Ascomietos Basidiomietos Deuteromietos
VI. Manano-Glucano	Saccharomietaceae Cryptococcaceae
VII. Manano-Quitina	Sporobolomietaceae Rhodotorulaceae
VIII. Poligalactosamina-Galactano	Grupo heterogêneo, parasitas de artrópodos.

Dentro de cada grupo taxonômico existe uma grande variação do conteúdo dos polissacarídeos determinantes de sua

classificação. Assim, no grupo V a concentração de quitina oscila entre 3-5% no Allomyces commune até aproximadamente 60% da parede celular de Allomyces macrogynus ou a de Sclerotium rolfisii. As principais classes de fungos, incluídas na categoria quitina-glucano, diferem uma das outras com respeito a açúcares não determinantes. As seguintes regras seriam aplicáveis: A galactose e a galactosamina seriam características da parede celular dos Ascomicetos, enquanto a xilose e a fucose o seriam dos Basidiomicetos (1).

No tocante ao processo de morfogênese em fungos, o que mais despertou a atenção dos pesquisadores é o dimorfismo/levedura-micélio (yeast-mold). Pensando em termos de que a parede celular deveria estar relacionada com esta extrema alteração morfológica, BARTNICKI-GARCIA (2) estudou a composição da parede de Mucor rouxii, o qual apresenta dimorfismo com a variação da pressão de CO_2 . Assim, havia alteração somente no conteúdo de manose e proteínas, os quais estavam em maior proporção na célula leveduriforme. Resultados semelhantes foram obtidos por BROWN & NICKERSON (3) com Pullularia pullulans, cuja parede do tipo levedura possui uma quantidade ligeiramente maior de manose que a da forma filamentosa. Embora os dados sugerissem que a manose poderia estar envolvida neste tipo de morfogênese, a parede de células leveduriformes induzidas termicamente de Histoplasma capsulatum tem, aproximadamente, 1/5 da quantidade de manose que a das filamentosas (4). Por outro lado, Saccharomyces cerevisiae crescido em condições limitantes de amônia, apresenta uma variação morfológica de esferóide para cilindróide, sem alteração do conteúdo de manose da parede celular (5). Outro caso de dimorfismo levedura-micélio, induzido termicamente, foi conseguido por KANETSUNA et alii (6) em Blastomyces dermatitidis. A parede das células tipo levedura tinha um menor conteúdo de hexoses (com menos manose) e um maior conteúdo de aminoaçúcares que a das filamentosas. Estudos mais refinados foram realizados com Paracoccidioides brasiliensis, o qual apresenta uma alteração morfológica caracterizada pela mudança da forma levedura (37°C) à forma

micelial (20°C). Estudo da composição da parede mostrou, além de diferenças estruturais entre os polissacarídeos neutros, que a forma de levedura possui mais hexosamina e menos proteína que a filamentosa (7).

Estudando condições que tornassem a parede celular de Cordyceps militaris mais susceptíveis ao rompimento, MARKS e KELLER (8) observaram que, quando a glucose era aumentada de 1-10% no meio de cultivo, formas unicelulares deste fungo filamentoso passavam a predominar. Em suas paredes existiam mais / glucose e proteínas; porém, menos lipídeos e hexosaminas que nas do tipo micelial. Ação de glucosidase (suco digestivo de caramujo) sugeria que a estrutura das paredes poderia ser diferente, pois enquanto toda glucose era liberada da parede celular da forma filamentosa, somente a metade da glucose era liberada da leveduriforme.

Entretanto, o desenvolvimento em forma de levedura/ deve ser visto como uma extrema alteração da morfologia das hifas. Em Neurospora crassa foi estudada por TATUM e colaboradores (9, 10) uma modificação menos pronunciada, ou seja, a indução fenotípica ou genotípica da restrição do espalhamento radial do micélio, chamado de "crescimento colonial". O crescimento colonial é caracterizado por um crescimento altamente restrito em meio sólido e crescimento em esferas (pellets) em meio líquido, em contraste ao crescimento filamentoso do tipo selvagem. As hifas também são menores, com numerosas ramificações e contorno ondulante. O estudo da composição da parede celular deste novo tipo morfológico demonstrou um aumento na relação hexosamina/glucose. O fracionamento da parede comprovou estar a principal modificação na fração alcali solúvel, a qual por hidrólise forneceu principalmente glucose, galactosamina e aminoácidos. Foi verificado que o crescimento tipo colonial era acompanhado por um decréscimo da afinidade da glucose-6-P desidrogenase por glucose-6-P e NADP, o que levaria, provavelmente por um efeito pleiotrópico, a uma alteração na morfologia (- (11). Não conseguindo uma explicação racional de como esses

açúcares estariam envolvidos nas modificações morfológicas, - MAHADEVAN e MAHADKAR (12) demonstraram que o crescimento tipo colonial de Neurospora crassa pode estar relacionado com o teor das enzimas hidrolíticas ligadas à parede (proteases e glucanases), pois a mutante possui um maior conteúdo dessas enzimas autolíticas. Procurando verificar se a composição da parede estava relacionada com suas propriedades, TREVITHICK e METZENBERG (13) estudaram uma mutante osmótica de Neurospora crassa, a qual possui uma parede menos espessa e mais irregular / que a do tipo selvagem. Os autores constataram que na parede da mutante a relação galactosamina/glucosamina era trinta vezes maior que na do tipo selvagem.

BONALY et alii (14) estudaram a influência das condições de cultivo na composição da parede celular de leveduras do gênero Rhodotorula. Estes microrganismos eram crescidos em dois meios, um contendo glucose e outro sacarose. As amostras RMP e 3044 apresentaram um conteúdo maior de glucosamina e menor de proteínas, quando crescidas em sacarose, enquanto a amostra 2200 apresentou a mesma composição química na parede, / crescida em ambas fontes de carbono.

Quando Picnoporus cinnabarinus foi cultivado em meio líquido, cuja fonte de carbono era D-glucose ou acetato, apresentou um desenvolvimento micelial distinto. Assim, em glucose, o micélio era esférico e compacto, enquanto em acetato era ligeiramente filamentososo, sendo possível imaginá-lo como formado por projeções filiformes partindo de um eixo central (observações pessoais da orientadora desta tese).

Essa diferença micelial morfológica nos motivou para o estudo da composição de suas paredes, já que nestas condições este fato não tinha sido relatado, e seria mais uma contribuição para o estudo de morfogênese em fungos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Microorganismo

A amostra de Picnoporus cinnabarinus, fungo da classe dos Basidionomicetos, foi isolada e classificada no Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná. Sua colocação taxonômica foi realizada também pelo Dr. Oswaldo Fidalgo do Instituto de Botânica, São Paulo.

2. Condições de Cultivo

A cultura foi mantida em agar Sabouraud glucose, e a inoculação feita diretamente deste para os meios líquidos:

Meio I:- D-glucose 1 g%, KH_2PO_4 0,9 g%, Na_2HPO_4 0,8 g%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2 g%, MgSO_4 0,02 g%, NH_4NO_3 0,1 g%, extra to de levedura 0,1 g%, MnSO_4 0,002 g%, CuSO_4 0,002 g%.

Meio II:- Semelhante ao meio I em que a D-glucose / foi substituída pelo acetato de sódio (1 g%) como fonte de carbono.

OpH dos meios de cultivo I e II foi ajustado para 6,2 e estes meios foram distribuídos (300 ml) em frascos de 1000ml. Os referidos meios foram autoclavados por 20 min. a 1 atm, sendo que a solução de D-glucose foi esterilizada durante 30 min. em vapor fluente, e em seguida acrescentada ao meio I no momento da inoculação.

A incubação foi feita a 28°C em um agitador rotatório a 100 rpm. Após 72 horas os micélios foram coletados por filtração e lavados com água destilada gelada.

3. Crescimento em Meio sólido

Fêz-se a inoculação de Picnoporus cinnabarinus - em placas contendo Sabouraud D-glucose 2 g% e Sabouraud acetato 2 g%. Após 72 horas de crescimento a 28°C, as placas foram fotografadas e as coloniais microfotografadas em Micros

cópio Olympus-Photonax.

4. Purificação das Paredes Celulares

Os micélios coletados e suspensos em água destilada foram homogeneizados por 1 min. em "Waring Blendor" e liofilizados em liofilizador "Virtis". Basicamente, foi utilizado o método de purificação descrito por MAHADEVAN (10), com as seguintes modificações: 1 g de pó micelial era tratado com 100 ml de SDS (dodecilsulfato de sódio) a 1 g%, a 4°C e com agitação. A intervalos de tempos variáveis suspendia-se o tratamento acima descrito, centrifugava-se a 20000 g / por 30 min. e analisava-se o espectro de absorção do sobrenadante na região do U.V. (220 a 340) em um espectrofotômetro registrador "Perkin-Elmer". O processo era repetido, suspendendo-se o precipitado em novo volume de SDS a 1 g%, até o desaparecimento de qualquer absorção na faixa de 260-280 nm.

Após este tratamento, as paredes celulares foram lavadas com água destilada por várias vezes (mínimo de dez) dialisadas em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 por 36 hs a 4°C, e por igual período de tempo em água destilada. A seguir, foram homogeneizadas por 1 min. em "Waring Blendor", liofilizadas e armazenadas em dessecador à vácuo sob P_2O_5 . Sempre antes de qualquer análise, as paredes celulares, em dessecador sob P_2O_5 , foram aquecidas a 50°C por 16 hs.

As seguintes abreviaturas serão utilizadas:-

Parede I = parede celular de Picnoporus cinnabarinus crescido no meio I.

Parede II = parede celular do mesmo fungo, crescido em meio II.

5. Exame ao Microscópio Eletrônico

Os micélios coletados como tal, e as paredes suspensas em água destilada, foram fixadas em glutaraldeído 5% e refixadas em ósmio 1%. Após inclusão em Epon 812, os cortes foram corados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo (15).

Estas análises foram feitas pelo Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, utilizando-se / um ultra microtomo "Sorvall MT-2", tipo Porter Blum e um microscópio "Philips EM-300".

6. Determinação dos Açúcares Totais

A determinação dos açúcares totais foi realizada / pelo método do Fenol-Sulfúrico (16) em suspensões de parede celular.

7. Determinação de Proteínas

Fêz-se a extração das proteínas das paredes celulares com NaOH N por 1 hora em banho-maria fervente. A seguir centrifugou-se a 700 g por 10 min., e alíquotas dos sobrenadantes foram analisadas pelo método de LOWRY (17). Padrão de sôro albumina bovina foi submetido às mesmas condições.

8. Análise dos Lipídeos

A extração dos lipídeos das paredes celulares foi feita com cloroformio: metanol (2:1) por 12 hs, em Soxhlet. A determinação quantitativa foi obtida por gravimetria.

9. Dosagem do Fósforo Total

A determinação do fósforo total foi realizada pelo método de FISKE-SUBBAROW (18), a partir de suspensões de parede celular.

10. Estudo dos Açúcares Neutros

10.1. Condições Otimas de Hidrólise:- As suspensões de parede celular, colocadas em ampôlas, acrescentou-se ácido trifluoroacético (TFA) até concentração final de 1 N (1mg/ml de parede). As ampôlas foram seladas, colocadas por 2 min. em autoclave a 1 atm e, a seguir, por diversos tempos de hidrólise em banho-Maria fervente. Após a hidrólise, o resíduo insolúvel foi eliminado / por filtração em funil de placa porosa, e o filtrado/

concentrado à vácuo para eliminar o excesso de ácido./ As frações solúveis dos hidrolisados foram aplicadas / às colunas de Dowex 50 W-X8 (H^+), 200-400 mesh, acopladas às colunas de Dowex 1-X8 ($HCOO^-$), 200-400 mesh, ambas de 0,8 x 5 cm (fluxo de 0,1 ml/min.). Os açúcares/ neutros foram eluídos com água destilada deionizada, até um volume final de 10 ml. Em alíquotas dos eluatos/ foram determinados: açúcar total pelo Fenol-Sulfúrico (16), açúcares redutores pelo SOMOGY-NELSON (19,20) e D-glucose pela glucose oxidase (21). D-glucose foi utilizada como padrão.

10.2. Determinação Quantitativa e Caracterização:- Amostras em duplicatas de 5 mg das paredes celulares I e II foram hidrolisadas por 8 horas, como acima descrito. Os hidrolisados foram centrifugados a 20000 g e os precipitados lavados três vezes com etanol. Os sobrenadantes foram reunidos, e o ácido eliminado à vácuo com temperatura não superior a 50°C. A purificação dos açúcares neutros foi realizada segundo a técnica descrita no ítem anterior. Os eluatos das duplicatas foram reunidos e acetilados de acordo com ALBERSHEIM (22). D-glucose/ recristalizada 3 x em metanol, e submetida às mesmas condições que as amostras, foi a elas acrescentada, antes da acetilação, para servir como padrão interno. Os polióis acetilados, extraídos quantitativamente com diclorometano, foram analisados em um cromatógrafo F & M modelo 810 R-12, nas seguintes condições: coluna de / 200 x 0,2 cm de d.i. com 3% p/p de ECNSS-M em Gas Chrom Q de 100-120 mesh (23), operando a 180°C; câmara de injeção e detetor a respectivamente 220 e 240°C; He, H₂ e ar a respectivamente 12, 20 e 300 ml/min.; atenuação 8 x 10. O cálculo das áreas foi feito por triangulação e os alditois acetilados caracterizados, comparando seus tempos de retenção com os de padrões conhecidos.

Os eluatos foram também cromatografados em pa-

pel Whatman nº 1, tendo como solvente Acetato de Etila: Piridina: Água (8:2:1). As manchas foram visualizadas / com cloridrato de p-anisidina (24) e com nitrato de prata alcalino (25).

11. Ação Enzimática do Suco Digestivo de Megalobolinus parana- / guenses nas Paredes Celulares

Suspensões de parede celular (2 ng/ml), em duplicatas, foram submetidas à ação do suco digestivo de M. parana- / guenses, nas seguintes condições: 50 µl de suco (5,8 ng/ml - proteína), 250 µl de suspensão de parede e 200 µl de tampão / citrato 0,0, M pH 6,0, a 37°C, com agitação, e em atmosfera - de tolueno. De tempos em tempos a reação era paralisada por a quecimento 5 min. a 100°C. Centrifugava-se por 10 min. a 700g e analisavam-se os sobrenadantes para glucose pelo método da glucose-oxidase (21) e, para N-acetilhexosamina pelo método de REISSIG (26), tendo-se respectivamente como padrões, D-glu cose e N-acetil-D-glucosamina.

Os produtos da ação enzimática foram, também, caract erizados por cromatografia em papel Whatman nº 1 com os se guintes sistemas de solventes: Butanol:Piridina: H₂O (6:4:3) (27), Acetato de Etila:Piridina:ácido Acético: H₂O (5:5:1:3), e visualizadas com nitrato de prata (25) e cloridrato de p-a nisidina (24).

12. Estudos dos Açúcares Aminados

12.1. Condições Ótimas de Hidrólise:- As paredes celulares / foram hidrolisadas em ampôlas seladas, em atmosfera de N₂, em banho-Maria fervente, na proporção de 2,5 mg de parede/ml de HCl 6 N. Os hidrolisados foram filtrados em funil de placa porosa, e o excesso de ácido elimina do à vácuo. Após a neutralização, os açúcares aminados/ foram purificados segundo BOAS (28), e determinados pe lo método de SOMOGYI-NELSON (19, 20), tendo-se como pa drão de referencia D-galactosamina. HCl.

12.2. Fracionamento e Caracterização:- Amostras em Duplica- / tas (2 mg) das paredes celulares I e II foram hidroli-

sadas por 8 hs, segundo as condições pré-estabelecidas (ítem 12.1). Os hidrolisados foram reunidos, filtrados quantitativamente em funil de placa porosa após adições e lavagens sucessivas com etanol. Tendo sido o excesso de ácido eliminado à vácuo com aquecimento não superior a 50°C, os aminoaçúcares foram:-

a) Determinados segundo BOAS (28): Assim, alíquotas dos hidrolisados das paredes celulares I e II, foram aplicadas à colunas de Dowex 50 W-X8 (H^+), 200-400mesh, de 0,8 x 5 cm. A coluna foi lavada com água destilada deionizada até eliminação total dos açúcares neutros. A seguir, os aminoaçúcares foram eluídos com HCl 2 N, num fluxo de 0,1 ml/min., até um volume total de 10 ml de eluato. O excesso de ácido das frações dos eluatos foi neutralizado à vácuo no próprio tubo de análise, após o que o conteúdo total de hexosaminas foi determinado pelo método de ELSON-MORGAN (29). D-glucosamina. HCl e D-galactosamina. HCl foram utilizadas como padrões.

b) Fracionadas de acordo com GARDELL (30): Hidrolisados das paredes celulares I e II foram aplicados à colunas de Dowex 50 W-X8 (H^+), 200-400 mesh, de 0,9 x 38 cm. Eluindo-se com HCl 0,3 N e fluxo de 1 ml/h, frações de 1 ml foram coletadas em coletor "GM". As análises foram feitas pelo método de ELSON-MORGAN, em alíquotas de 0,5 ml dos eluatos.

Os hidrolisados das paredes celulares I e II apresentaram duas frações, que foram caracterizadas por:-

(A) perfil de eluição (31); (B) cromatografia ascendente das frações em papel Whatman nº 1, utilizando-se Piridina: Acetato de Etila: Ácido Acético: H_2O (5:5:1:3:) como solvente (32). A revelação foi feita com o reativo de ELSON-MORGAN (33) e com galactose oxidase (34); e (C) desaminação segundo STOFFYN (35), seguida de cromatografia dos produtos em papel What-

man nº 1, tendo como solvente Butanol:Etanol: H₂O (- (4:1:1) e revelação com cloridrato de p-anisidina(24)

Com respeito à essas frações, serão utilizadas as seguintes abreviaturas:-

A_I e A_{II} para as primeiras frações obtidas dos hidrolisados das paredes celulares I e II, respectivamente.

B_I e B_{II} para as correspondentes eluídas posteriormente.

12.3. Determinação de N-acetilglucosamina: A determinação de N-acetilglucosamina foi realizada após ação de suco digestivo de Megalobolinus paranaguenses nas paredes celulares. As condições de ensaio já foram descritas anteriormente (ítem 11), sendo feita 50 horas de incubação para a parede celular I e 70hs para a parede celular II, após o que os sobrenadantes foram analisados pelo método de REISSIG (26), tendo como padrão N-acetil-D-glucosamina.

13. Estudo dos Açúcares Ácidos

As paredes celulares I e II foram hidrolisadas / com ácido fórmico 98% e com HCl 1% (36). Material insolúvel foi eliminado por centrifugação. Após eliminar o excesso de ácido à vácuo, os produtos de hidrólise foram passados através de uma coluna de Dowex 1-X8 (HCOO⁻), 200-400 mesh. Açúcares neutro e aminados foram eluídos com água destilada / deionizada, e os açúcares ácidos com ácido fórmico 2 N , sendo este último eluato analisado pelo método do Carbazol/ (29) cromatograficamente em Acetato de Etila:Piridina:Ácido Acético: H₂O (5:5:1:3) (36).

14. Reagentes Utilizados

Dodecilsulfato de sódio (SDS), Quitina, sôro albumina bovina cristalina, peroxidase, glucose oxidase (tipo II), D-galaotosanina, HCl, D-glucosamina.HCl, D-manosamina,

N-acetil-D-glucosamina e N-acetil-D-galactosamina eram da Sigma Chemical Co. O-dianisidina foi fornecida pela Nutritional Biochemicals Corporation e D-glucose e D-xilose pela Pfanstehl Lab. Dimetilaminobenzaldeído (recrist. 2 x em H₂O) e ácido trifluoroacético eram da Merck. Galactose oxidase foi preparada a partir de Polyporus circinatus, segundo a técnica de AVIGAD (34).

RESULTADOS - DISCUSSÃO

1. Crescimento em meio sólido

As figuras 1 e 2 mostram que, enquanto o crescimento em glucose é restrito, em acetato o micélio é filamentosso e se espalha radialmente. Pelas microfotografias (figuras 3 e 4), observa-se que as hifas crescidas em glucose / são bastante ramificadas, enquanto que as crescidas em acetato são longas e pouco ramificadas.

Este comportamento é semelhante ao descrito para as alterações morfológicas de Neurospora crassa (9), o qual pode ser induzido por mutação, variação da fonte de carbono (adição de sarbose ao meio de cultura), pela temperatura de incubação, ou pelo acréscimo de suco digestivo de Helix pomatia ao meio de cultura.

A forma das hifas de Picnoporus cinnabarinus crescido em Sabouraud glucose é semelhante às do tipo colonial/ de Neurospora, enquanto que a das crescidas em Sabouraud acetato correspondem às da forma selvagem de Neurospora.

2. Microscopia Eletrônica

Como se pode observar pelas micrografias eletrônicas nas figuras 5 e 6, a parede celular das hifas de Picnoporus cinnabarinus é de maior espessura quando ele é crescido no meio I. Isto nos sugere que existam diferenças entre as paredes deste fungo, nas condições de estudo. Entretanto, essa alteração não precisa ser necessariamente quantitativa pois pode estar relacionada com diferentes disposições estruturais dos polímeros nas paredes.

3. Purificação das Paredes

Muitos métodos para purificação existem, e a obten

ção de paredes celulares livres de contaminação citoplasmática é o primeiro problema com relação ao seu estudo (36).

Considerando que os ácidos nucleicos e as proteínas apresentam absorção na faixa de 260-280 nm, utilizou-se este dado como indicativo da liberação do conteúdo endocelular. Assim, se isto estivesse ocorrendo, deveria haver um desaparecimento gradativo desta absorção em função do tempo de tratamento com SDS. Além disso, os açúcares totais e proteínas foram determinados nos sobrenadantes, observando-se o desaparecimento de ambos em função do tempo.

Com base nestes fatos, considerou-se as paredes celulares de Picnoporus cinnabarinus purificadas após 31 hs de tratamento (figuras 7 e 8), o que foi confirmado / pelas análises ao microscópio eletrônico (figuras 9 e 10).

MAHADEVAN (10) considerou as paredes de Neurospora crassa puras após 16 horas de tratamento com SDS, tendo como comprovação o exame das hifas por microscopia de contraste de fase. Embora utilizando a mesma técnica, torna-se difícil fazer alguma correlação, pois além dos critérios de purificação empregados serem diferentes, os microrganismos pertencem a classes distintas.

Durante a purificação das paredes celulares de Picnoporus cinnabarinus se observou que o fungo crescido / em acetato liberava seu conteúdo celular mais rapidamente como se pode observar pelas figuras 7 e 8, indicando uma maior fragilidade ao tratamento com detergente.

4. Conteúdo de Lipídeos

A porcentagem de lipídeos na parede celular de fungos é um critério de purificação, pois segundo TAYLOR (37): "Lipídeos em excesso de 8-10% devem ser cuidadosamente examinados para se determinar se o processo de preparação de parede foi rigorosamente suficiente para remover / contaminantes citoplasmáticos". Como pode ser observado na

tabela I, a porcentagem de lipídeos extraídos das paredes celulares I e II está dentro deste limite de precaução, / não havendo diferenças em suas concentrações com a variação da fonte de carbono.

5. Conteúdo de Fósforo

Embora a pequena porcentagem de fósforo (tabela I) possa estar relacionada com uma possível contaminação/ por ácidos nucleicos, o fato de açúcares fosfatados terem sido detectados em outros fungos (38, 39, 40), leva a sugerir a possibilidade da participação de fosfato na estrutura das paredes de Picnoporus cinnabarinus. Não obstante ser esta porcentagem muito baixa, há uma significativa diferença na concentração de fósforo total, sendo que as paredes celulares do fungo crescido em glucose apresentam um teor de 50% a mais.

Fato semelhante ocorre na transformação micélio levedura do Mucor rouxii (41), pois se observou que a parede celular das formas filamentosas apresentavam uma concentração maior de fósforo total que as leveduriformes. Já, em Blastomyces dermatitidis (6) se constatou uma porcentagem maior de fósforo total na parede das células tipo leveduras.

6. Conteúdo de proteínas

Considerando a advertência de BARTNICKI-GARCIA (41), de que a análise direta de proteínas da parede pelo método LOWRY produzia turbidez, e a pelo Biureto um precipitado azul, tentou-se extrair as proteínas das paredes / sem sucesso, com NaOH a frio (17). Somente aumentando-se a concentração de alcali e com aquecimento é que se conseguiu determiná-las (tabela I), sendo feito tratamento paralelo do padrão a fim de se corrigir possíveis alterações nos aminoácidos. Extrações de proteínas de paredes

celulares, em condições semelhantes a estas, têm sido amplamente utilizadas (37).

No presente caso, as alterações morfológicas observadas não estão relacionadas com o teor de proteínas (tabela I), fato este que não se verificou nos casos de dimorfismo nicélio-levedura (7, 8) e na alteração de morfologia de amostras de Rhodotorula em diferentes condições de cultivo (14). Entretanto, no caso do crescimento tipo colonial de Neurospora crassa (9) também não se constatou modificação na concentração proteica.

7. Conteúdo de Açúcares Totais

A porcentagem de açúcares totais determinada nas paredes celulares I e II, na realidade representa a porcentagem de açúcares neutros totais, já que açúcares ácidos/não foram detectados, e os aminados dão reação negativa com o Fenol-Sulfúrico (42).

Analizando-se os dados da tabela I, concluímos que as paredes celulares de Picnoporus cinnabarinus crescido em glucose ou acetato, não apresentam alterações / quanto à concentração de açúcares neutros totais.

8. Composição em Açúcares Neutros

As condições para o estudo dos açúcares neutros foram bastante dificultadas devido à insolubilidade das paredes celulares. As curvas de hidrólise da figura - 11, mostram que o tempo de 8 horas pode ser considerado / como ótimo, em termos de rendimento destes açúcares liberados. Os açúcares neutros foram determinados por cromatografia gasosa (figura 12), estando suas porcentagens / apresentadas na tabela I. O conteúdo de glucose das paredes celulares I e II foi confirmado pela reação específica da glucose oxidase.

Para o fato de ser a porcentagem em açúcares - neutros liberados por hidrólise (glucose + manose) inferior à de açúcares neutros totais (ítem anterior - tabela I), duas explicações são viáveis: a primeira seria devido às condições ácidas de hidrólise, mas como se observa pelas curvas da figura 11, mesmo após 8 horas não houve destruição significativa dos açúcares. Outra possibilidade seria que os polímeros das paredes não foram totalmente hidrolisados. Considerando as diferentes labilidades a ácidos das ligações glicosídicas, isto seria justificável, pois em paredes celulares de fungos, os polissacarídeos variam, normalmente, quanto a sua estrutura (1). Além disso, como se observa pela figura 11, a porcentagem de açúcares totais é maior que a dos redutores, sugerindo a existência de oligossacarídeos.

Na maioria dos casos de dimorfismo levedura-micélio estudadas (2, 3, 4, 6, 7 e 8) constatou-se uma alteração na concentração de açúcares neutros das paredes celulares. Entretanto, na modificação tipo colonial de Neurospora (9) e nas alterações por variação do meio de cultivo em Rhodotorula (14) não foram observadas diferenças significativas, o mesmo acontecendo no presente caso (tabela I).

CROOK (43) estudando a composição em açúcares/neutros da parede de algumas espécies de Basidiomicetos, demonstrou que a glucose e a manose estavam sempre presentes, enquanto a galactose, xilose e fucose variavam. Em Dendryphiella vinosa (44) foi observada a presença de galactose, juntamente com glucose e manose, enquanto que em Polyporus tumulosus (45) além de glucose detectou-se manose e xilose. Verifica-se, portanto, que glucose e manose são componentes constantes das paredes de Basidiomicetos, enquanto os demais açúcares neutros são variáveis.

9. Composição em Açúcares Aminados

As condições de hidrólise estabelecidas para a determinação de aminoaçúcares mostram que o tempo de 8 horas pode ser considerado como ótimo para a liberação / destes açúcares das paredes celulares I e II (figura 13).

Como se observa pela figura 14, os açúcares aminados de ambas as paredes foram separados em colunas trocadora de íons em duas frações, as quais foram caracterizadas pelas seguintes propriedades:-

a) Por desaminação as frações A_I e A_{II} deram origem à arabinose e B_I e B_{II} à lixose, o mesmo ocorrendo / respectivamente com os padrões de D-glucosamina e D-galactosamina. Entretanto, D-nanosamina e D-talosamina também originam por desaminação respectivamente a arabinose e lixose. Logo, por estes resultados as frações A_I e A_{II} devem corresponder à glucosamina ou à nanosamina, e as frações B_I e B_{II} à galactosamina ou talosamina.

b) As frações A_I, A_{II} e B_I, B_{II} apresentaram no bilidades cromatográficas semelhantes aos padrões de D- / glucosamina e de D-galactosamina, e distintas à de D-nanosamina, o que permite supor que as frações A_I e A_{II} devem se identificar com a glucosamina.

c) Somente as frações B_I e B_{II} são visualizadas pela galactose oxidase, à semelhança do padrão de D-galactosamina. Embora no trabalho da galactose oxidase, a talosamina não tenha sido testada como substrato, o fato de serem as mobilidades cromatográficas de galactosamina e talosamina distintas com o solvente empregado (32), sugere que as frações B_I e B_{II} devem corresponder à galactosamina.

d) CRUMPTON (31) comprovou que a relação entre o volume de eluente necessário para eluir a concentração-

da mesma coluna é constante, independente das dimensões da coluna de resina empregada, e da normalidade do eluente ácido na faixa de 0,25-0,50 N. Esta razão é chamada de Rglucosamina, e como pode ser visto na tabela II, os resultados obtidos com as frações estão de acordo com os de CRUMPTON (31) e de DMYTRACZENKO (46), permitindo identificar as frações A_I e A_{II} como glucosamina, e as frações B_I e B_{II} como galactosamina.

e) Como toda glucosamina das paredes celulares I e II está na forma de N-acetilglucosamina (tabelas I e III) concluímos que as frações A_I e A_{II} correspondem realmente à glucosamina.

Como pode ser visto pela tabela I, existe um interessante balanço no teor de hexosaminas da parede celular de P. cinnabarinus crescido em fonte de carbono variável. Assim, enquanto a parede do fungo crescido em glucose tem mais que o dobro de galactosamina que a parede do crescido em acetato, o qual por sua vez apresenta um conteúdo maior de glucosamina, de tal maneira que a porcentagem total de hexosaminas é maior no crescido em acetato.

Alteração no teor de glucosamina da parede celular está também relacionado com o dimorfismo de Blastomyces dermatitidis (6) e Paracoccidioides brasiliensis (7). A parede das células leveduriformes destes microrganismos possuem uma concentração maior desta hexosamina que a parede das filamentosas. Entretanto, em Cordyceps militaris (8) é encontrada uma porcentagem maior de hexosaminas na parede das filamentosas. Mesmo nos casos de modificações menos pronunciadas da morfologia existe uma alteração do teor de aminoaçúcares das paredes. Isto ocorre tanto no caso de leveduras do gênero Rhodotorula (14), como no caso do crescimento tipo colonial de Neurospora (9). Assim, a parede celular de Neurospora crassa, tipo colonial, tem u-

na concentração maior de glucosamina que a do tipo selva/gen. Com relação à alteração no teor de galactosamina da parede celular de Picnopus, ressalta-se que resultados semelhantes foram obtidos só nos casos de mutação em Neurospora crassa (12, 47). Logo, os dados obtidos no presente caso levam a supor que as alterações no teor de hexosaminas da parede celular de Picnopus cinnabarinus devem também estar relacionadas com as modificações morfológicas ocorridas.

O fato de já ter sido demonstrado em Neurospora crassa (39) que os polímeros de galactosamina da parede funcionam como receptores de polifosfato, permitiria correlacionar a porcentagem maior de fósforo total com a de galactosamina na parede celular de Picnopus cinnabarinus / crescido em glucose (tabela I), sugerindo que a galactosamina estaria na parede na forma de polímero.

A identificação de galactosamina nas paredes celulares de Picnopus cinnabarinus contraria a regra de que esta hexosamina é açúcar característico apenas da parede dos Ascomicetos (1).

10. Ação Enzimática do Suco Digestivo de Megalobolinus paranaguenses

Suco digestivo de Helix pomatia (fonte comercial) é amplamente utilizado para o estudo estrutural e caracterização de quitina em paredes celulares de fungos (8, 38, 44, 40).

O suco digestivo de Megalobolinus paranaguenses catalisa a hidrólise de quitina liberando como produto N-acetilglucosamina, indicando que ele contém entre outras / enzimas, uma quitinase. As paredes celulares I e II ensaiadas com o suco deste caramujo (figura 15) foram degradadas, mostrando existir nas paredes de Picnopus cinnabarinus um polímero tipo quitina, e que os glucanos presentes / nos dois tipos de paredes estudadas devem diferir, já que

bela III).

Analisando os dados da tabela III, observa-se / que enquanto 70% das glucoses contidas na parede celular de Picnoporus cinnabarinus crescido em glucose são liberadas pelas enzimas do suco digestivo de Megalobolinus paraguayenses, somente 45% o são liberadas da parede do crescimento em acetato. O fato de glucano α 1,3 ser componente da parede celular de fungos (1) e glucanase α 1,3 estar ausente em suco digestivo de Helix pomatia (38), sugere a / possibilidade da existência de um glucano deste tipo, diferenciando quantitativamente a parede celular de Picnoporus cinnabarinus nas condições em estudo. Embora estas suposições necessitem de confirmação experimental, resultados semelhantes a estes foram relatados no dimorfismo de Paracoccidioides brasiliensis (7). Alteração na composição de glucanos parece estar também relacionado com o crescimento tipo colonial de Neurospora, pois o fracionamento da parede celular mostrou que extrato alcali solúvel está sensivelmente aumentado com relação ao tipo selvagem (10).

O fato de encontrar quitina como principal componente da parede e glucanos como segundo, confirmam os critérios morfológicos que classificaram Picnoporus cinnabarinus como um Basisioniceto, situando-o dentro do grupo V da classificação taxonômica de BARTNICKI-GARCIA (1).

O isolamento e a determinação da estrutura dos / polímeros de glucose, manose e galactosamina, são análises complementares necessárias à explicação global das alterações morfológicas observadas.

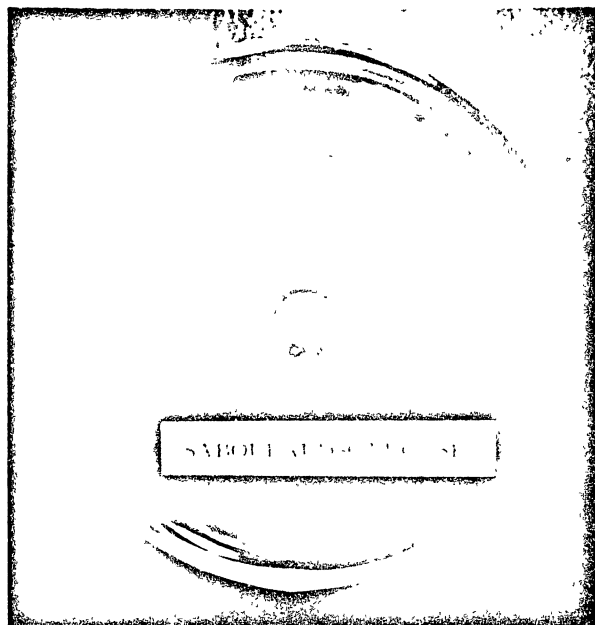


Figura 1. Pichnopus cinnabarinus crescido em Sabouraud D-glucose por 72 horas a 28°C.

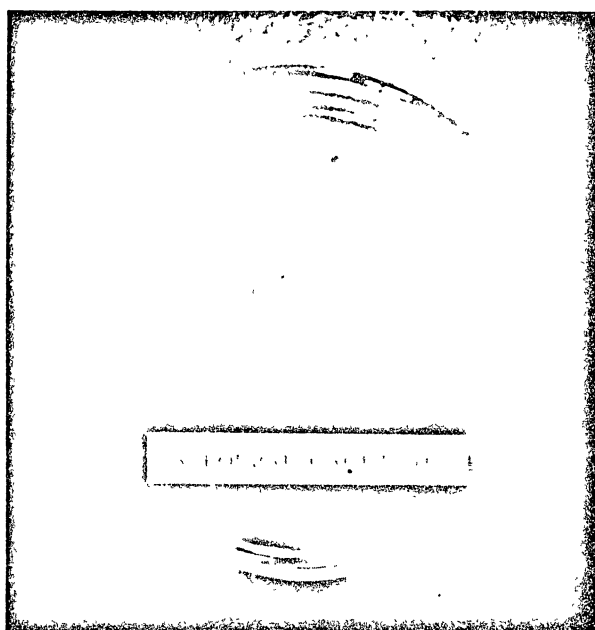


Figura 2. Pichnopus cinnabarinus crescido em Sabouraud acetato por 72 horas a 28°C.



Figura 3. Microfotografia (x 1200) de Picnopus cinnabarinus crescido em Sabouraud D-glucose. Cultura de 72 horas a 28°C.

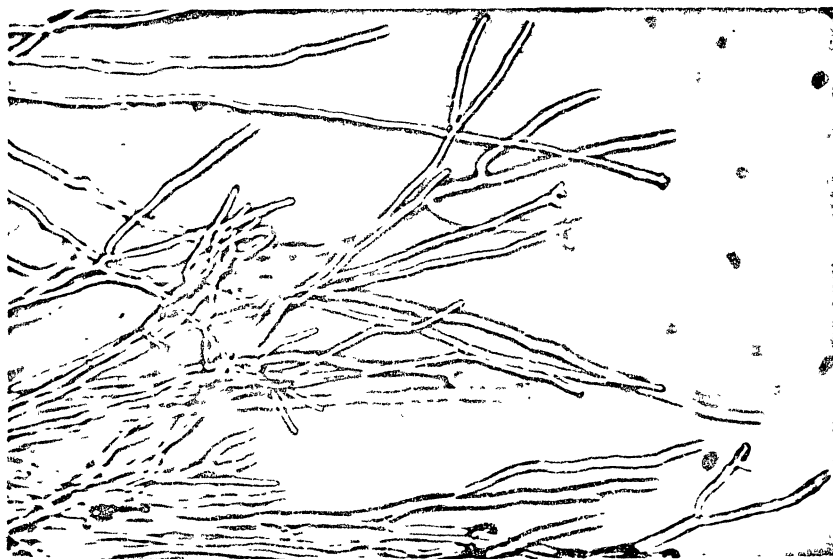


Figura 4. Microfotografia (x 1200) de Picnopus cinnabarinus crescido em Sabouraud acetato. Cultura de 72 horas a 28°C.



Figura 5. Micrografia eletrônica (x 36930) de Picnopus cin-
nabarinus crescido em glucose.

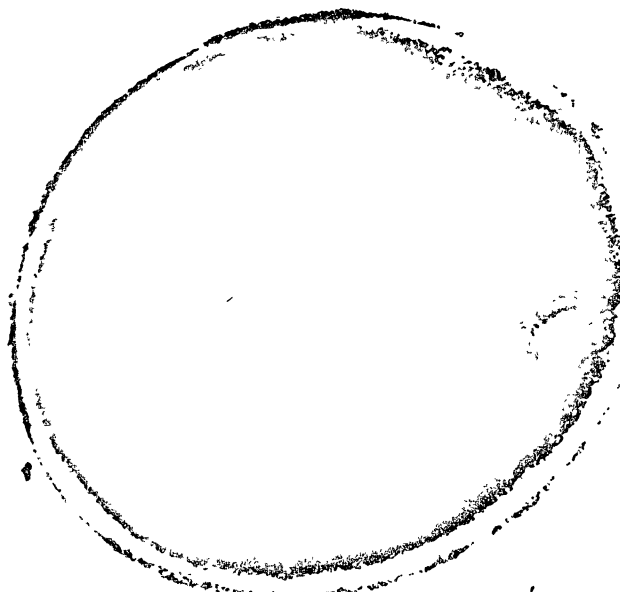


Figura 6. Micrografia eletrônica (x 36930) de Picnopus cin-
nabarinus crescido em acetato.

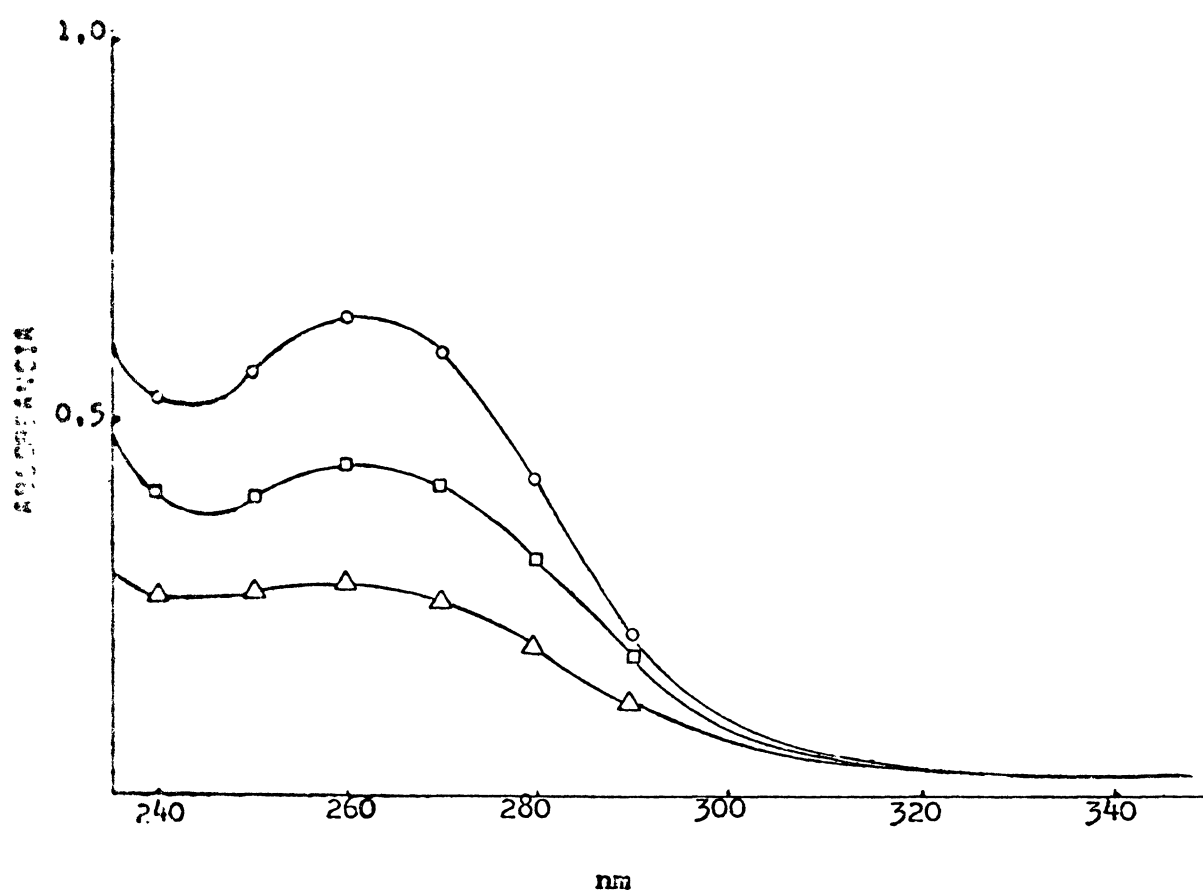


Fig. 7. Comprovação da purificação da parede celular I .
Espectro de absorção do sobrenadante de 20 000 g,
em função do tempo de tratamento com SDS 1%: após
3 hs (○—○) (dil. 8x); 16 hs (□—□) e após
31 hs (△—△) de tratamento.

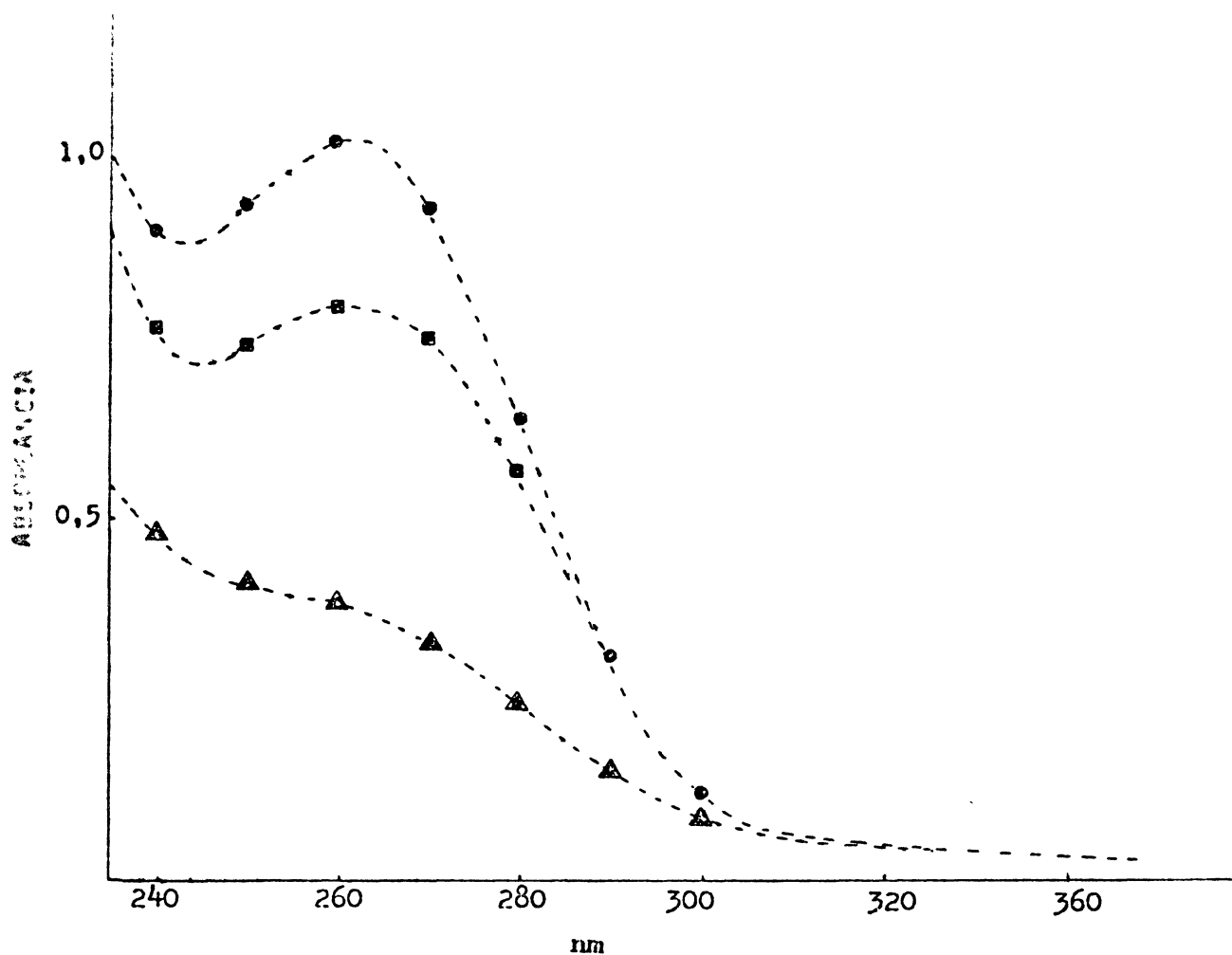


Fig. 8. Comprovação da purificação da parede celular II.
Espectro de absorção do sobrenadante de 20 000 g, em função do tempo de tratamento com SDS 1%: após 3 hs (•- - -•) (dil. 15x); 13 hs (■- - -■) (dil. 2x) e após 31 hs (▲- - -▲) de tratamento.



Figura 9. Micrografia eletrônica (x 36930) da parede celular de Picnopus cinnabarinus crescido em glucose.



Figura 10. Micrografia eletrônica (x 36 930) da parede celular de Picnopus cinnabarinus crescido em acetato.

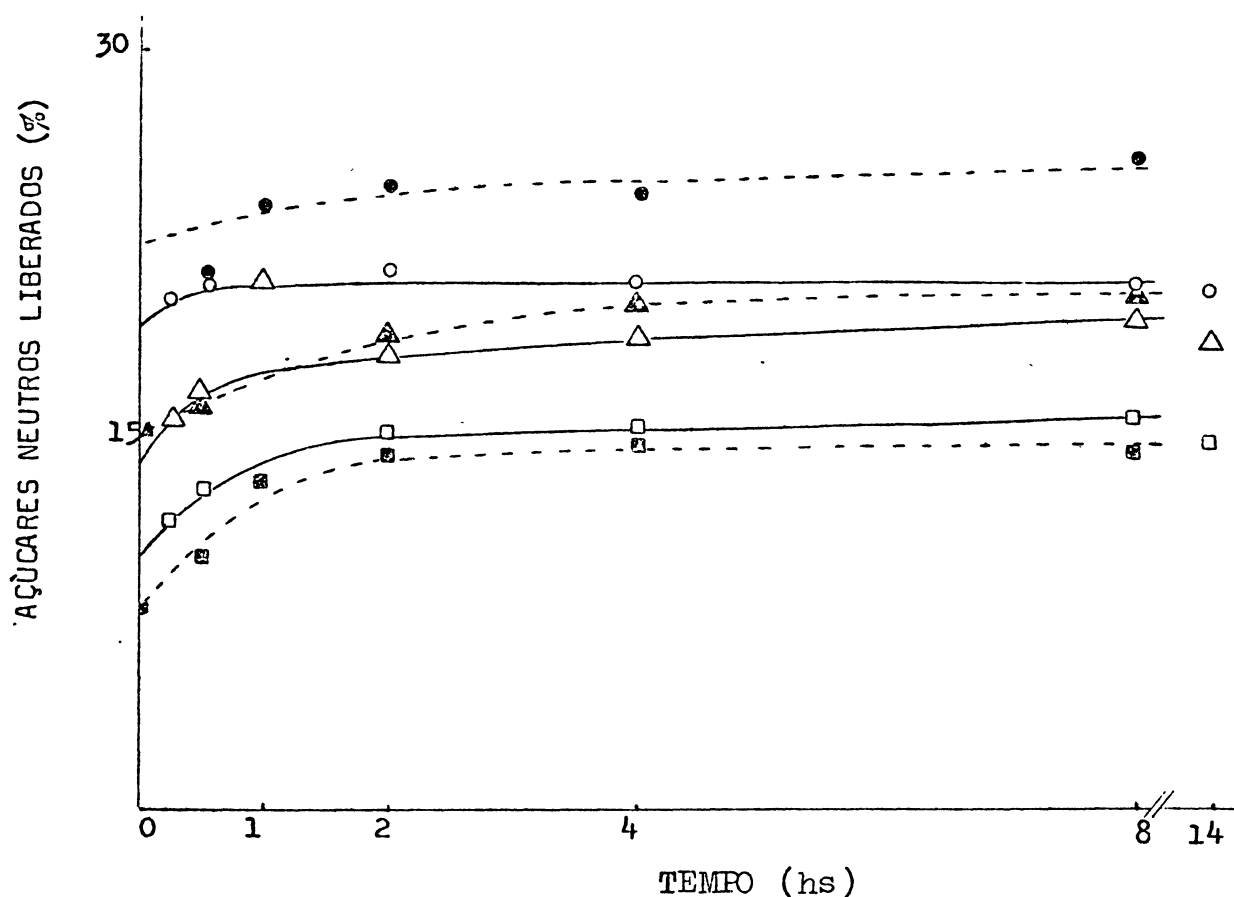


Fig. 11. Condições ótimas de hidrólise para o estudo de açúcares neutros. Açúcares neutros liberados das paredes celulares em função do tempo de hidrólise: glucose (□—□), açúcares redutores (Δ—Δ) e açúcar total (○—○) liberados da parede I. Glucose (■---■), açúcares redutores (▲---▲) e açúcar total (●---●) liberados da parede II. Os dados são expressos em porcentagem de açúcares liberados por peso seco de parede.

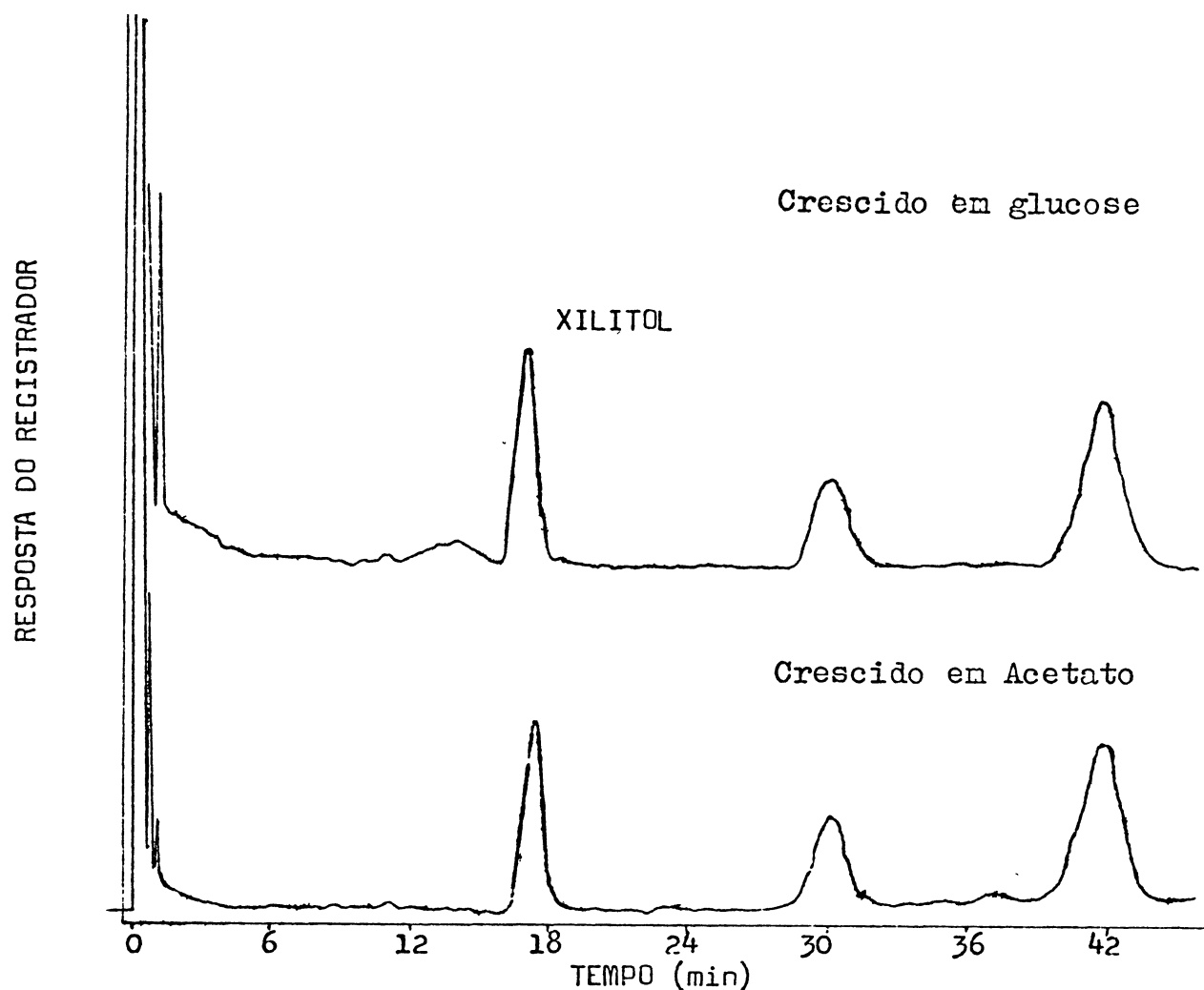


Fig. 12. Cronatografia em fase gasosa dos açúcares neutros acetilados. Cronatógrafo F & M modelo 810 R-12 com detetor de ionização de chama. Coluna 3% p/p ECNSS M sobre gas chrom Q de 100-200 mesh, de 200 x 0,2 cm (d.i.) a 180°C (isoterma), com detetor a 240°C, câmara de injeção a 220°C e fluxo de He de 12 ml / min. Padrão interno: xilitol.

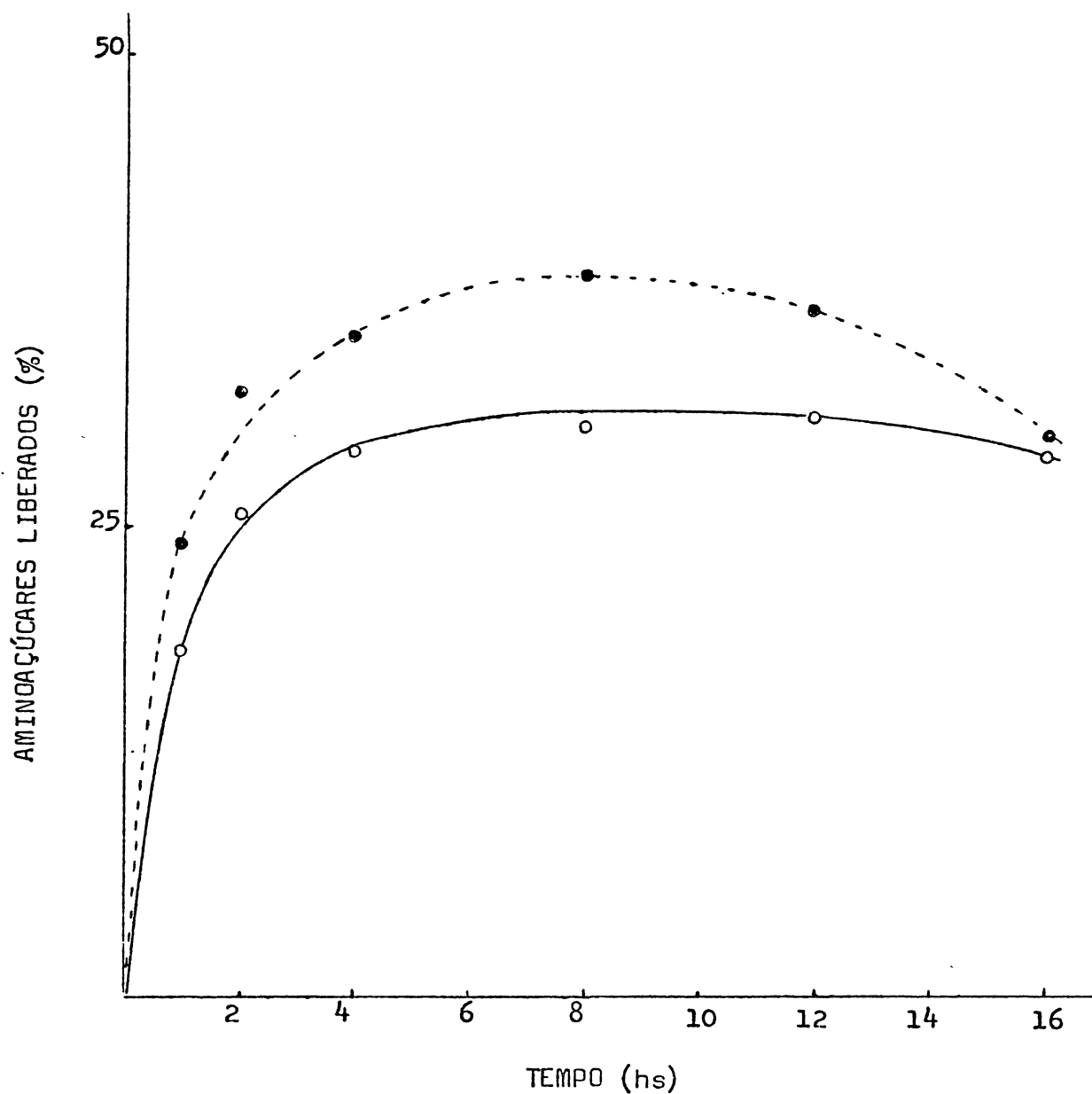


Fig. 13. Condições ótimas de hidrólise para o estudo de açúcares aminados. Aminoaçúcares liberados da parede celular I (o—o) e da parede celular II (*----*), em função do tempo de hidrólise. Os dados são expressos em porcentagem do peso seco de parede celular.

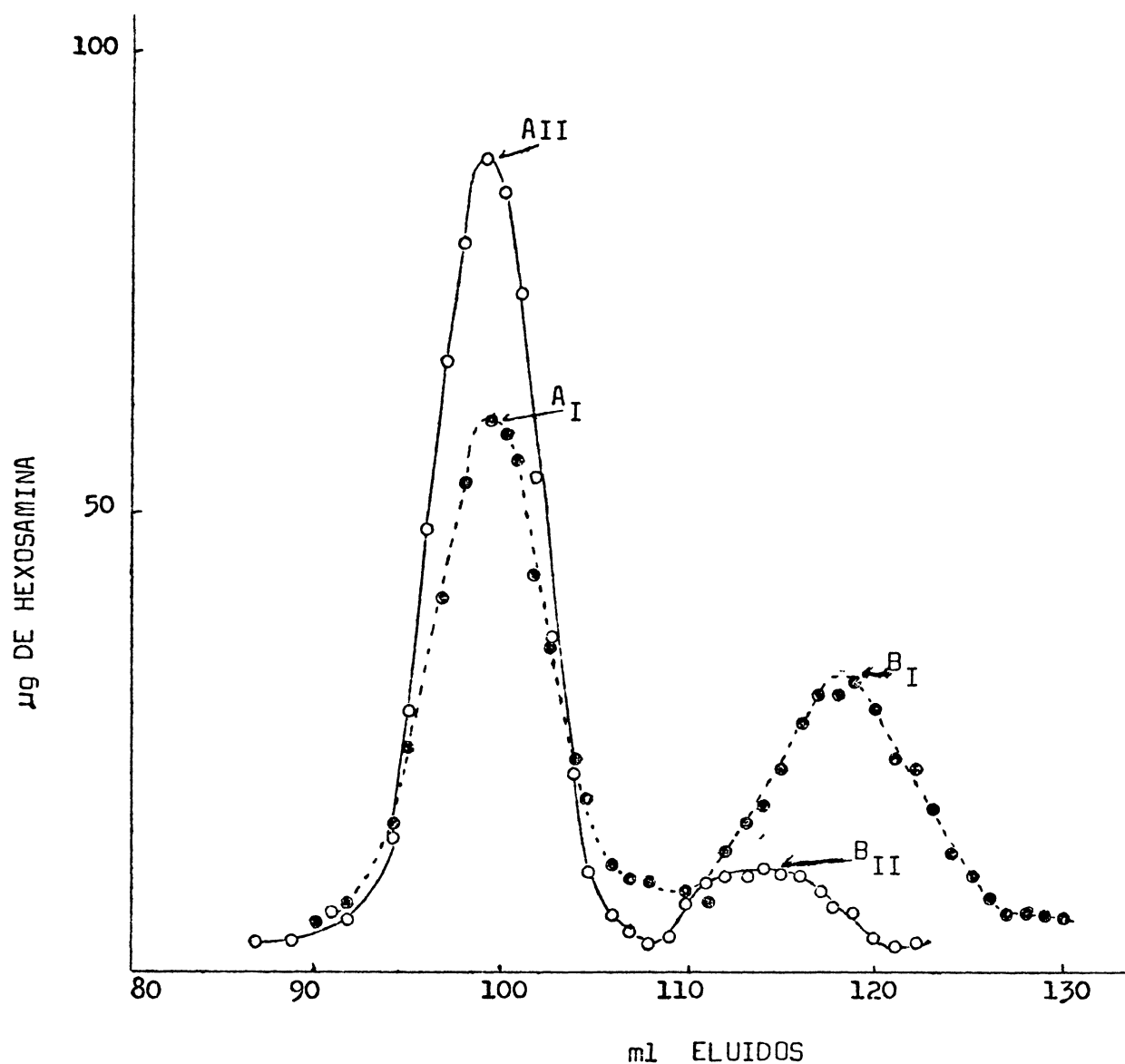


Fig. 14. Fracionamento das hexosaminas obtidas por hidrólise de 2 ng de parede celular I (•-----•) e II (○———○), em coluna de Dowex 50-X8 (H^+), 200-400 mesh, utilizando HCl 0,3 N como eluente. Aliquotas de 0,5 ml dos eluentes foram analisadas pelo método de ELSON-MORGAN (29).

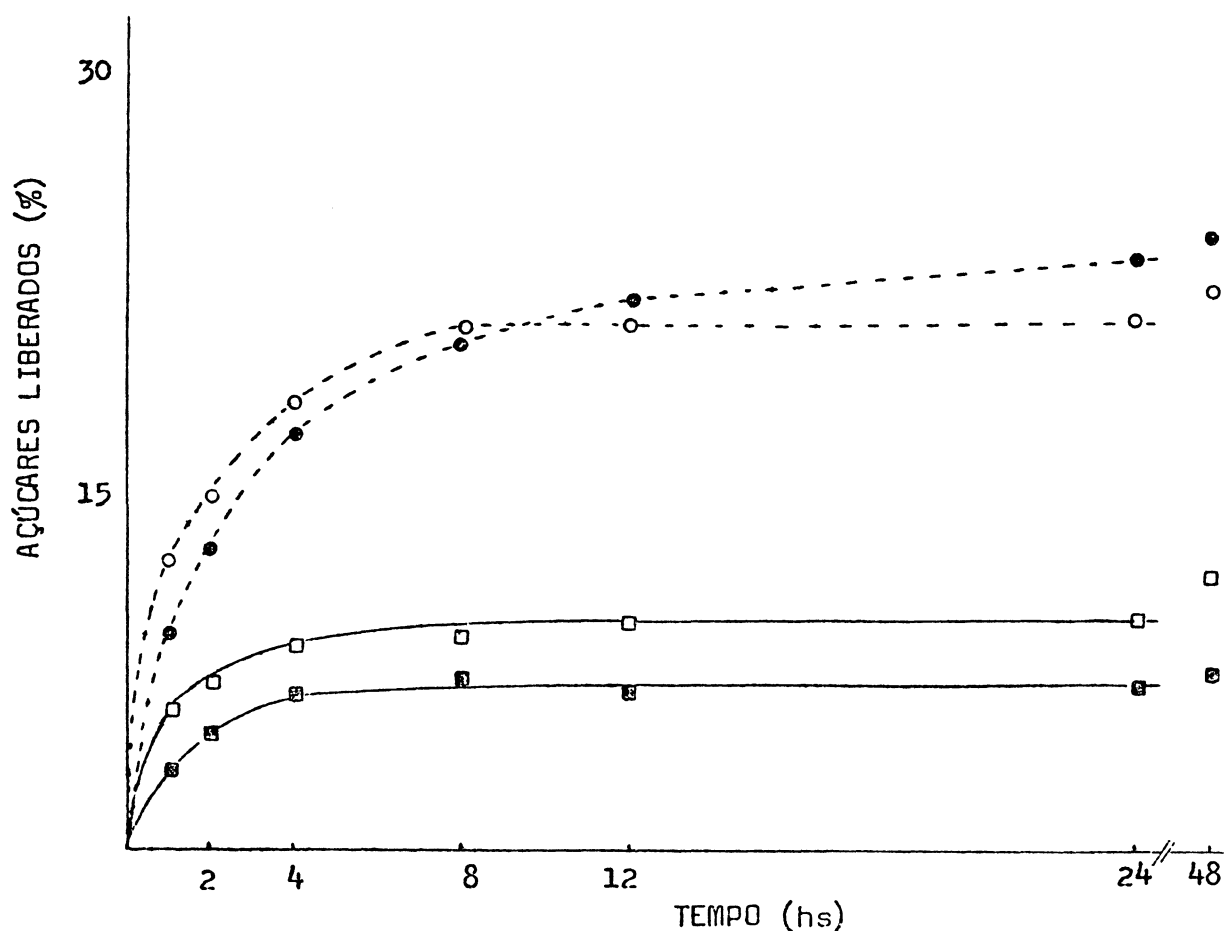


Fig. 15. Ação enzimática do suco digestivo de Megalobolinus paranaguenses nas paredes celulares. Açúcares liberados (% do peso seco de parede) em função do tempo de incubação. Sistema de incubação: 500µg de parede, 290 µg de proteína e tampão citrato 0,01 M, pH 6,0 para volume final de 0,5 ml. Temperatura de 37°C, com agitação e em atmosfera de tolueno. Os sobrenadantes dos ensaios com as paredes celulares foram analisados: glucose liberada da parede celular I (□—□) e da parede II (■—■) e N-acetilhexosamina liberada na parede I (○---○) e da parede II (●---●).

TABELA IComposição da parede celular de Picnopus cinnabarinus

Componentes	% do peso seco de parede	
	crescido em glucose	crescido em acetato
Açúcar Total	30,0	30,0
Glucose	16,0	16,0
Manose	7,0	8,0
Glucosamina	20,0	32,0
Galactosamina	12,0	5,0
Proteínas	9,0	10,0
Lipídeos	9,5	10,0
Fósforo	1,5	1,0

TABELA IICaracterização das hexosaminas da parede celular de Picnopus cinnabarinus, em função de seus $R_{\text{glucosamina}}$.

Razão	$R_{\text{glucosamina}}$
B_I/A_I	1,19
B_{II}/A_{II}	1,15
Galactosamina/glucosamina	$(1,20 \pm 0,02)^*$
Galactosamina/glucosamina	1,19 **
Talosamina/glucosamina	$(1,60 \pm 0,02)^*$

* Dados de Crumpton (31)

** Dados de Dnytraczenko (46)

A_I e B_I respectivamente, primeira e segunda fração do hidrolisado de parede celular I, eluídas de uma coluna de resina.

A_{II} e B_{II} frações correspondentes ao hidrolisado de parede II.

TABELA III

Liberação de glucose e N-acetilglucosamina da parede celular de Picnopus cinnabarinus por enzimas do suco digestivo de Megalobolinus paranaguenses

Açúcares Liberados e Contidos nas Paredes	% do peso seco de parede	
	crescido em glucose	crescido em acetato
Glucose Liberada pelo suco	11,0	7,0
Glucose Total da parede	16,0	16,0
N-acetilglucosamina Liberada pelo suco	21,0	30,0
Glucosamina Total da Parede	20,0	32,0

RESUMO

Quando Picnoporus cinnabarinus foi crescido em meio líquido e sólido contendo glucose ou acetato como fonte de carbono, o desenvolvimento micelial foi distinto. Análises químicas e enzimáticas demonstraram que as paredes celulares continham N-acetil-D-glucosamina, galactosamina, glucose, manose, proteínas, lipídeos e fósforo, havendo uma alteração significativa no teor das hexosaminas quando da variação das condições de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Ann. Rev. Microbiol., 22: 87-108, 1968.
2. BARTNICKI-GARCIA, S. Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi. III. Mold-yeast dimorphism of Mucor. Bacteriol. Rev., 27: 293-304, 1963.
3. BROWN, R.C. & NICKERSON, W.J. apud BARTNICKI-GARCIA, S. cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Ann. Rev. Microbiol., 22: 87-108, 1968.
4. DOMER, J.E., HAMILTON, J.G. & HARKIN, J.C. Comparative study of the cell walls of the yeastlike and micelial phases of Histoplasma capsulatum. J. Bacteriol., 94: 466-74, 1967.
5. McMURROUGH, I. & ROSE, A.H. Effect of growth rate and substrate limitation on the composition and structure on the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. Biochem. J., 105: 189-203, 1967.
6. KANETSUNA, F. & CARBONELL, L.M. Cell wall composition of the yeastlike and mycelial forms of Blastomyces dermatitidis. J. Bacteriol., 106: 946-48, 1971.
7. KANETSUNA, F., CARBONELL, L.M., AZUMA, I. & YAMAMURA, Y. Biochemical studies of the thermal dimorphism of Paracoccidioides brasiliensis. J. Bacteriol., 110: 208-18, 1972.
8. MARKS, D.B. & KELLER, B.J. Growth of unicellular forms of the fungus Cordyceps militaris and analysis of the chemical composition of their walls. J. Gen. Microbiol., 69: 253-59, 1971.
9. de TERRA, N. & TATUM, E.L. A relationship between cell wall structure and colonial growth in Neurospora crassa. Am. J. Botany, 43: 669-77, 1963.
10. MAHADEVAN, P.R. & TATUM, E.L. Relationship of the major constituents of the Neurospora crassa cell wall to wild-type and colonial morphology. J. Bacteriol., 90: 1073-81, 1965.
11. BRODY, S. & TATUM, E.L. The primary biochemical effect of a morphological mutation in Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 56: 1290-97, 1966.

12. MAHADEVAN, P.R. & MAHADKAR, U.R. Role of enzymes in growth and morphology of Neurospora crassa: Cell-wall bound enzymes / and their possible role in branching. J. Bacteriol., 101: 941-47, 1970.
13. TREVITHICK, J.R. & METZENBERG, R.L. Genetic alteration of pore size and other properties of the Neurospora crassa cell / wall. J. Bacteriol., 92: 1016-20, 1966.
14. BONALY, R., MOULKI, H., BENJELLOUN, A.T. & PIERFITTE, M. Étude des parois de levures du genre Rhodotorula. II. Influence des conditions de culture sur la composition chimique des parois. Biochem. Biophys. Acta, 244: 484-94, 1971.
15. GONZALEZ-SANTANDER, R. La tincion - Los corantes electronicos. In: Tecnicas de Microscopia electronica en biologia. Madrid, Aguilar, 1969. p. 507-616.
16. DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350-56, 1956.
17. LOWRY, O.M., ROSENBERG, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-75, 1951.
18. LELIOT, L.F. & CARDINI, C.E. Characterization of phosphorus / compounds by acid lability. In: Colowick, S.P. & Kaplan, N. O. Methods in Enzymology, vol. III, 1st ed., New York, Acad. Press, 1957. p. 840-50.
19. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160: 61-8, 1945.
20. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153: 375-80, 1944.
21. HUGGET, A. STG. & NIXON, D.A. Enzymic determination of blood - glucose. Biochem. J., 66: 12P, 1957.
22. ALBERSHEIM, P., NEVINS, D.J., ENGLISH, P.D. & KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res., 5: 340-45, 1967.

23. SAWARDEKER, J.S., SLONEKER, J.H. & JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. Anal. Chem., 37: 1602-04, 1965.
24. HOUGH, L., JONES, J.K.N. & WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixture of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper / chromatogram. J. Chem. Soc., 1702, 1950.
25. TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166: 444-45, 1950.
26. REISSIG, J.L., STROMINGER, J.L. & LELOIR, L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem., 217: 959-66, 1955.
27. CARDINI, C.E. & LELOIR, L.F. Enzymatic formation of acetylga-/lactosamine. J. Biol. Chem., 225: 317-24, 1957.
28. BOAS, N.F. Methods for the determination of hexosamines in tissues. J. Biol. Chem., 204: 553-63, 1953.
29. ASHWELL, G. Colorimetric analysis of sugars. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology. vol. III, 1st ed., New York, Acad. Press, 1957. p. 73-105.
30. GARDELL, S. Separation on Dowex 50 ion exchange resin of glucosamine and galactosamine and their quantitative determination. Acta Chem. Scand., 7: 207-15, 1953.
31. CRUMPTON, M.J. Identification of amino sugars. Biochem. J., 72: 479-86, 1959.
32. HORTON, D. Monosaccharide amino sugars. In: JEANLOZ, R.W. The amino sugars. vol. IA, New York and London, Acad. Press, / 1969, p. 1-212.
33. SMITH, I. Sugars. In: Chromatographic and Electrophoretic techniques. 2nd ed, London, William Heinemann Medical Books, 1960 p. 246-260.
34. AVIGAD, G., AMARAL, D., ASENSIO, C. & HORECKER, B.L. The D-galactose oxidase of Polyporus circinatus. J. Biol. Chem., 237: 2736-43, 1962.
35. STOFFYN, J.P. & JEANLOZ, W.R. Identification of amino sugars by paper chromatography. Arch. Biochem. Biophys., 52: 373-79, 1954.

36. GANCEDO, J.M., GANCEDO, C. & ASENSIO, C. Uronic acids in fungal cell walls, Biochem. Z., 346: 328-32, 1966.
37. TAYLOR, I.E.P. & CAMERON, D.S. Preparation and quantitative analysis of fungal cell walls: strategy and tactics. Ann. Rev. Microb., 27: 243-59, 1973.
38. BUCK, K.W. & OBAIDH, M.A. The composition of the cell wall of Fusicoccum amygdali. Biochem. J., 125: 461-71, 1971.
39. HAROLD, F.M. Binding of inorganic polyphosphate to the cell wall of Neurospora crassa. Biochem. Biophys. Acta, 57: 59-66, 1962.
40. THIEME, T.R. & BALLOU, C.E. Nature of the phosphodiester linkage of the phosphomannan from the yeast Kloeckera brevis. / Biochemistry, 10: 4121-29, 1971.
41. BARTNICKI-GARCIA, S. & NICKERSON, W.J. Isolation, Composition/ and Structure of cell wall of filamentous and yeast-like / forms of Mucor rouxii. Biochem. Biophys. Acta, 58: 102-19, 1962.
42. AMINOFF, D., BINKLEY, W.W., SCHAFFER, R. & MOWRY, R.W. Analytical methods for carbohydrates. In: PIGMAN, W. & HORTON, D. The carbohydrates - Chemistry/Biochemistry, vol. IIB, 2nd ed., New York and London, Acad. Press, 1970. p. 740.
43. CROOK, E.M. & JOHNSTON, I.R. The qualitative analysis of the cell walls of selected species of fungi. Biochem. J., 83: / 325-31, 1962.
44. BONALY, R. Études sur la structure glucidique des parois du champignon Dendryphiella vinosa (Berk et Curt) Reisinger. Carbohydr. Res., 24: 355-64, 1972.
45. RALPH, B.J. & BENDER, V.J. Isolation of two new polysaccharides from the cell wall of Polyporus tumulosus. Chem. Ind. (London), 26: 1181, 1965.
46. DMYTRACZENKO, A. Distribuição de hexosaminas em vários órgãos de Bionphalaria glabrata. Curitiba. 1969. 19 p. Tese. Univ. Fed. Paraná. Instituto de Bioquímica.
47. GRATZNER, H.G. Cell wall alterations associated with the hyperproduction of extracellular enzymes in Neurospora crassa J. Bacteriol., 111: 444-46, 1972.

48. MDRENO, R.E., KANETSUNA, F. & CARBONELL, L.M. Isolation of chitin and glucan from the cell wall of the yeast form of Paracoccidioides brasiliensis. Arch. Biochem. Biophys. 130: 212-17, 1969.

De quem o incentivo partiu
e o estímulo persistiu,
Que meu amor seja a
recompensa.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Déa Amaral, orientadora desta tese, pelo incentivo, apoio e confiança com que conduziu este trabalho.

À Dra. Glaci T. Zancan, Coordenadora deste Curso de Pós-Graduação pela indispensável colaboração na redação desta tese.

À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / (CAPES), pela necessária ajuda financeira pessoal e, À CAPES e BNDE-FUNTEC pelo apoio à pesquisa deste Departamento.

Ao Dr. José H. Duarte pelo fornecimento do suco digestivo de / Megalobolinus paranaguenses.

Ao Dr. Orlando T. de Freitas, do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, (mantido em parte pelo - CNPq) pelas micrografias eletrônicas.

Ao Dr. Orisel Curial pela colaboração na obtenção das microfotografias, e

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e ao IBPT e a todos seus componentes que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.